



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 43 44 646 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/53
G 01 N 27/327
C 12 Q 1/26

②① Aktenzeichen: P 43 44 646.9
②② Anmeldetag: 24. 12. 93
④③ Offenlegungstag: 29. 6. 95

DE 43 44 646 A 1

⑦① Anmelder:
Scheller, Frieder, Prof. Dr., 16341 Zepernick, DE

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

Der Inhalt dieser Schrift weicht von den am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab

⑤④ Vorrichtung für einen kompetitiven Immuno-Assay zur Bestimmung von Haptenen

⑤⑦ Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung für einen kompetitiven immuno-Assay sowie ein Verfahren zur Bestimmung von Haptenen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind der Umweltschutz und die medizinische Diagnostik. Die Vorrichtung ist durch einen hochempfindlichen Sensor gekennzeichnet, der in Kontakt steht mit

- Antikörpern gegen das zu bestimmende Hapten, die sich gegebenenfalls in der Meßlösung befinden,
- der Meßlösung, welcher eine definierte Menge des mit dem Redoxlabel markierten Haptens und gegebenenfalls Kosubstrate für die Biokatalysatoren zugesetzt sind, und ggf.
- einem Signaltransduktor.

Die Messung erfolgt ohne Wasch- und Trennungsschritte und ermöglicht die Erfassung von Haptenen in bis zu 2 Größenordnungen geringeren Konzentrationen als bei den bekannten Verfahren.

DE 43 44 646 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
BUNDESDRUCKEREI 05. 95 508 026/443.

5/31

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung für einen kompetitiven Immuno-Assay sowie eine Verfahren zur Bestimmung von Haptenen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind der Umweltschutz und die medizinische Diagnostik.

Haptene (z. B. Toxine, Drogen) sind niedermolekulare Antigene, die zwar mit Antikörpern reagieren können, aber selbst keine immunogene Aktivität besitzen. Es ist bekannt, Haptene auf immunologischem Wege zu bestimmen. In DE 41 26 692.7 ist eine Immunosensor-Vorrichtung zur Bestimmung von Antigenen < 2000 Dalton beschrieben, die aus einem oder zwei Enzym-Immunreaktoren und einem Biosensor besteht, wobei der Biosensor mit mindestens einem Enzym beschichtet ist und die Meßlösung, der ein Substrat für ein Enzymkonjugat des Immunreaktors und gegebenenfalls Cosubstrate zugesetzt sind, von den Immunreaktoren zum Biosensor fließt.

Die Verdrängung des Enzymkonjugats gemäß dieser Patentanmeldung erfordert relativ hohe Konzentrationen an Hapten, da nur bei hochaffinen Antikörpern das "Auswaschen" auch ohne Hapten in der Meßlösung zu vernachlässigen ist. Deshalb liegt die Nachweisgrenze nur bei 100 nanomolar bis 1 mikromolar.

In EP 27036 sind Enzym-Immunoassays beschrieben, die nach folgender Methode arbeiten: Das Produkt des Markerenzym wird in einem cyclisch arbeitenden Enzympaar unter Bildung einer meßbaren Verbindung vielfach umgesetzt, so daß eine Steigerung der Empfindlichkeit erzielt wird.

Die Kopplung des enzymatischen Verstärkungssystems mit dem Enzym-Immunoassay führt jedoch zu einer erheblichen Komplizierung des Systems. Das Hauptproblem liegt bei Spuren an Verunreinigungen im Substrat für das Markerenzym, da diese Verbindungen zu einem hohen Leerwert führen.

Redox-Label, d. h. eine Konjugation mit oxidierbar/reduzierbaren Verbindungen mit dem Analyten, sind bei M. Green "Electrochemical Immunoassays" (Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 316, S. 135—142 (1987)) beschrieben. Durch die Bindung an den Antikörper wird die Umsetzung des Labels mit einem der Meßlösung zugesetztem Enzym unterdrückt. Damit wird die Konzentration des freien Redoxlabels ohne Waschschrift für die Messung mit einer üblichen Elektrode zugänglich.

Die Empfindlichkeit dieses Assays ist durch den hohen Background limitiert und erlaubt nur die Konzentrationsbestimmung in mikromolarem Konzentrationsbereich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Empfindlichkeit der bisher bekannten Verfahren für die meisten Haptenbestimmungen nicht ausreicht. Darüber hinaus ist von Nachteil, daß in der letztgenannten Publikation die elektrochemische Aktivität nicht vollständig durch die Bindung an den Antikörper eliminiert wird und dadurch meist ein störender Background auftritt.

Die Erfindung hat das Ziel, die Bestimmung von Haptenen einfach zu gestalten und ohne Trennungs- und Waschschriffe in einem pseudohomogenen Immunoassay durchzuführen, wobei die Empfindlichkeit gegenüber den bekannten Methoden um mindestens eine Größenordnung erhöht werden soll. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung für einen kompetitiven Immuno-Assay zu entwickeln, mit der diese Zielstellung erreicht werden kann.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch einen

- Antikörpern gegen das zu bestimmende Hapten, die sich gegebenenfalls in der Meßlösung befinden
- der Meßlösung, welcher eine definierte Menge des mit einem Redoxlabel markierten Haptens und gegebenenfalls Kosubstrate für die Biokatalysatoren zugesetzt sind, und ggf.
- einem Signaltransduktor steht.

Die Erfindung wird gemäß der Ansprüche 1 und 8 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Als hochempfindlicher Sensor wird erfindungsgemäß entweder ein Enzymreaktor mit getrenntem Signaltransduktor oder ein Enzymsensor mit integriertem Signaltransduktor eingesetzt. Der hochempfindliche Sensor enthält ein Enzym oder eine Kombination von Enzymen. Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der Erfindung besteht darin, daß die verwendeten Enzyme eine hohe Aktivität gegenüber dem mit dem Redoxlabel konjugierten Hapten aufweisen.

Bevorzugt geeignet sind die Enzyme Tyrosinase oder Laccase entweder allein oder in Kombination mit Cytochrom b2, Oligosacchariddehydrogenase oder Glucosedehydrogenase.

Die Antikörper gegen das zu bestimmende Hapten befinden sich entweder direkt auf dem hochempfindlichen Sensor, oder sie werden gemeinsam mit dem mit einem Redoxlabel markierten Hapten der Meßlösung zugesetzt.

Ein weitere Ausführungsform der Erfindung besteht darin, als dritte Komponente auch das zur Bestimmung verwendete Enzym bzw. die Enzymkombination der Meßlösung zuzusetzen und die Konzentration mit einer Elektrode zu messen.

Als Meßlösung wird bevorzugt eine luftgesättigte Pufferlösung von pH 4,5 bis 7 verwendet.

Besonders geeignete Redoxlabel sind gemäß der Erfindung o- und p-Aminophenol, Hydrochinon, Brenzcatechin oder Ferrocenderivate, wobei die Brücke zwischen Hapten und Redoxlabel 2—10 C-Atome lang ist. Bevorzugte Enzym/Redoxlabel-Kombinationen sind Tyrosinase/Brenzcatechin und Laccase/Hydrochinon.

Als Signaltransduktoren dienen amperometrische oder potentiometrische Elektroden, Thermistoren oder Optoden. Ein wesentlicher Unterschied zu den bisher bekannten Verfahren besteht darin, daß der Meßlösung kein Hapten-Enzym-Konjugat zugesetzt werden muß, weil die Empfindlichkeit des Enzymsensors für die direkte Messung des mit dem Redoxlabel markierten Haptens ausreicht. Das breite Substratspektrum der beteiligten Enzyme ist Voraussetzung für den effektiven Umsatz des Redox-Label-Haptens. Eine Trennung freies Hapten-/gebundenes Hapten-Konjugat ist nicht erforderlich, da der Hapten-Konjugat-Antikörperkomplex nicht vom hochempfindlichen Sensor erfaßt wird.

Dadurch ist ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens — eine Messung ohne Wasch- und Trennungsschritte — bedingt. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß Haptene in bis zu 2 Größenordnungen geringeren Konzentrationen erfaßt werden können, d. h. bis zu einer Konzentration von 10^{-9} molar (bekannte Verfahren bis zu 10^{-7} molar). Damit können wichtige Bestimmungen für den Umweltschutz (z. B. von Herbiziden, Pestiziden und Fungiziden) und in den klinischen Labors (z. B. von niedermolekularen Hormonen, Steroiden, Adrenalin, Tyroxin und dessen Derivaten) mit höherer Genauigkeit und mit we-

sentlich geringerem Aufwand durchgeführt werden.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Beispiel 1

Das Enzym (NADH-unabhängige) Glucosedehydrogenase (EC. 1.1.99.17) wird auf einer Elektrode aus Glas-kohlenstoff (Durchmesser 2 mm) wie folgt immobilisiert:

1,5 mg GDH (320 Units/mg) werden in 50 µl 0,5 mM Pyrrolochinolinchinon gelöst und mit 50 µl 20%-igem Polyvinylalkohol vermischt. 3 µl der Mischung werden auf der Elektrodenoberfläche gleichmäßig aufgetragen und diese Schicht durch Belichten mit UV vernetzt. Danach wird die Enzymschicht mit einer Dialysemembran abgedeckt.

Dieser "hochempfindliche" Sensor wird in eine gerührte Meßzelle (Volumen ≈ 0,5 ml) eingebracht, und die Elektrode auf + 500 mV gegenüber einer großflächigen Ag/AgCl-Elektrode, die sich ebenfalls in der Meßzelle befindet, mit einem Polarographen polarisiert. Als Redoxlabel des Analyten dient p-Aminophenol. Dieses ist über eine C-4-Kette mit der NH-Gruppe an das Atrazin gebunden. Dieses Konjugat wird nach bekanntem Verfahren aus dem entsprechenden Carbonsäurederivat des Atrazin und Aminophenol unter der Wirkung von Carbodiimid hergestellt.

Für das mit einem Redoxlabel markierte Hapten (Analyt) wird eine Eichkurve (I-C-Kurve) im Bereich von 0,1 bis 20 nM durch Zugabe der entsprechenden Konzentrationen in die Meßzelle und Auswertung der Strom-Zeit-Kurve aufgenommen.

Die Meßlösung von 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 8) enthält 10 mM Glucose.

Zur Bestimmung von Atrazin in Wasserproben wird eine Eichkurve des kompetitiven Immunoassays aufgenommen. 250 µl der 0,1–5 nM atrazinhaltigen Wasserprobe und 250 µl 0,1 M Phosphatpuffer, die 4 nM des Atrazin-Redoxlabels enthalten, werden in die Meßzelle gegeben. Danach werden 5 µl einer Lösung zugesetzt, die spezifische Antikörper gegen Atrazin enthält. Dabei erfolgt eine Verdünnung des Ausgangsserums, das 5–10 mg/ml des spezifischen Antikörpers enthält, so daß in der Meßzelle eine Antikörperkonzentration von 2 nM vorliegt.

Genau 10 min nach Zugabe der Antikörper in die Meßzelle wird 50 µl 100 mM Glucose zugesetzt und der Anstieg des Stromes ausgewertet.

Bei der Bestimmung der Atrazinkonzentration in Wasserproben wird nach der gleichen Vorschrift der Stromanstieg bestimmt und über die Eichkurve die gesuchte Konzentration ermittelt.

Beispiel 2

Als hochempfindlicher Sensor zur Anzeige des freien Redoxlabels wird folgende modifizierte Clark-Typ-Elektrode benutzt:

Glucosedehydrogenase und Laccase werden gemeinsam in Polyvinylalkohol eingeschlossen, und diese Schicht zwischen einer (gasdurchlässigen) Polypropylenfolie (Dicke ≈ 5 µm) und einer Dialysemembran (Ausschlußgrenze von 15 kDalton) vor einer O₂-Elektrode plaziert. Die Enzymmembran enthält 300 U/cm² GDM und 250 U/cm² Laccase. Zur Vernetzung wird die Photopolymerisation mit UV-Bestrahlung benutzt.

Die Messung erfolgt bei einem konstanten Potential

von –600 mV. Ag/AgCl.

Als Redoxlabel wird Ferrocen benutzt, das nach bekannter Präparationsvorschrift mit Atrazin verknüpft wird.

Die Bestimmung der Atrazinkonzentration erfolgt analog zu Beispiel 1.

Patentansprüche

1. Vorrichtung für einen kompetitiven Immuno-Assay zur Bestimmung von Haptenen, gekennzeichnet durch einen hochempfindlichen Sensor, der in Kontakt steht mit

- Antikörpern gegen das zu bestimmende Hapten, die sich gegebenenfalls in der Meßlösung befinden,
- der Meßlösung, welcher eine definierte Menge des mit einem Redoxlabel markierten Haptens und gegebenenfalls Kosubstrate für die Biokatalysatoren zugesetzt sind, und ggf. einem Signaltransduktor.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der hochempfindliche Sensor Laccase, Tyrosinase oder Laccase gemeinsam mit Cytochrom b2 enthält.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Antikörper gegen das zu bestimmende Hapten direkt auf dem hochempfindlichen Sensor befinden.

4. Vorrichtung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Antikörper gegen das zu bestimmende Hapten in der Meßlösung befinden.

5. Vorrichtung nach Anspruch 1–4, dadurch gekennzeichnet, daß als Meßlösung eine luftgesättigte Pufferlösung von pH 4,5 bis 7 verwendet wird.

6. Vorrichtung nach Anspruch 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß als Redoxlabel o- und p-Aminophenol, Hydrochinon, Brenzkatechin oder Ferrocenderivate verwendet werden.

7. Vorrichtung nach Anspruch 1–6, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzym/Redoxlabel-Kombinationen Tyrosinase/Brenzkatechin oder Laccase/Hydrochinon eingesetzt werden.

8. Verfahren zur Bestimmung von Haptenen mittels der Vorrichtung für einen kompetitiven Immuno-Assay nach den Ansprüchen 1–7, dadurch gekennzeichnet, daß man die das Hapten enthaltende Probe mit einer definierten Menge des mit einem Redoxlabel markierten Haptens versetzt, mit den immobilisierten Antikörpern gegen das Hapten wechselwirken läßt und die Menge des ungebundenen Haptenkonjugats direkt mit dem hochempfindlichen Sensor mißt.

9. Verfahren zur Bestimmung von Haptenen mittels der Vorrichtung für einen kompetitiven Immuno-Assay nach den Ansprüchen 1–7, dadurch gekennzeichnet, daß man die das Hapten enthaltende Probe mit einer definierten Menge des mit dem Redoxlabel markierten Haptens und den Antikörpern gegen das Hapten versetzt und die Menge des ungebundenen Haptenkonjugats direkt mit dem hochempfindlichen Sensor mißt.

- Leerseite -